

**Einfluß von Benzaron auf die
fibrinolytische Aktivität der Lunge
und der V. Jugularis bei der Ratte**

Astrid von der Goltz

1979

Aus dem
Institut für Experimentelle Chirurgie
(Direktor: Prof.Dr.med.G.Blümel)
der
Technischen Universität München
vorgelegt über das
Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München
Lehrstuhl: Prof.Dr.M.Merkenschlager

EINFLUSS VON BENZARON AUF DIE FIBRINOLYTISCHE AKTIVITÄT
DER LUNGE UND DER V.JUGULARIS BEI DER RATTE

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde des
Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Astrid von der Goltz

aus

Düsseldorf

München 1979



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

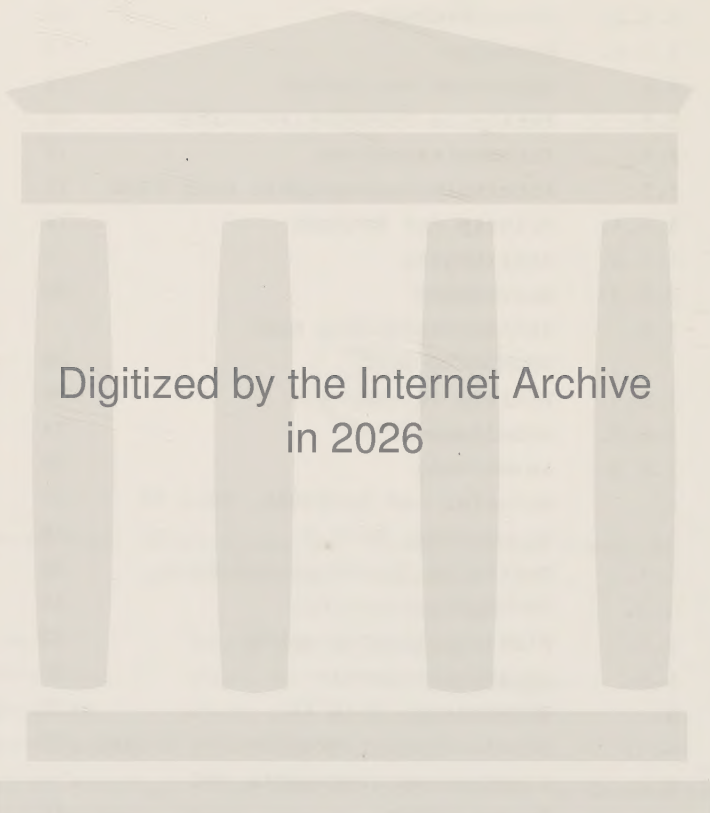
Dekan:	Prof. Dr. H. Kräußlich
1.Referent:	Prof. Dr. M. Merckenschlager
2.Referent:	Prof. Dr. D. Hegner
1.Korreferent:	Prof. Dr. E. Dahme
2.Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. Dr. habil. K. Osterkorn
3.Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. H.-G. Liebich

Tag der Promotion: 27.Juli 1979

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	Einleitung	1
2.	Zielsetzung	5
3.	Material und Methodik, Teil I	7
3.1.	Beschreibung der Substanzen	8
3.1.1.	Aprotinin	8
3.1.2.	Tranexamsäure	10
3.1.3.	Benzaron	12
3.2.	Operation der Ratten	13
3.3.	Partielle Thromboplastinzeit	14
3.4.	Thrombelastogramm	15
3.5.	Fibrinolyseautographie nach TODD	15
3.5.1.	Prinzip der Methode	16
3.5.2.	Arbeitsgang	17
3.5.3.	Auswertung	20
3.6.	Inhibitornachweis nach NOORDHOEK-HEGT	20
3.6.1.	Prinzip der Methode	20
3.6.2.	Arbeitsgang	22
3.6.3.	Auswertung	25
4.	Material und Methodik, Teil II	25
5.	Ergebnisse, Teil I	28
5.1.	Partielle Thromboplastinzeit	28
5.2.	Thrombelastographie	29
5.3.	Fibrinolyseautographie	32
5.4.	Inhibitornachweis	35
6.	Ergebnisse, Teil II	36
6.1.	Fibrinolyseautographie der Lungen	37
6.2.	Fibrinolyseautographie der Vv.jugulares	40
7.	Diskussion	43
8.	Zusammenfassung	47
9.	Summary	49
10.	Literaturverzeichnis	51



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551927_0015

Abb. 1: Direkte und indirekte Aktivierung des Plasmingens	2
Abb. 2: Strukturformel von Aprotinin	8
Abb. 3: Strukturformel der Tranexamsäure	10
Abb. 4: Strukturformel von Benzaron	12
Abb. 5: Schema der Fibrinolyseautographie	16
Abb. 6: Arbeitsgang der Fibrinolyseautographie	19
Abb. 7: Schema des Reaktionsablaufes bei der Sandwich-Slide-Technik	21
Abb. 8: Arbeitsgang des Inhibitornachweises	24
Abb. 9: Statistische Auswertung der partiellen Thromboplastinzeit	28
Abb. 10: Statistische Auswertung der Reaktionszeit "r"	29
Abb. 11: Statistische Auswertung der Gerinnselektionszeit "k"	30
Abb. 12: Statistische Auswertung der Maximalamplitude "Ma"	31
Abb. 13: Aufzeichnung der Lysegrade der Lungen nach einer Inkubationszeit von 30, 60 und 90 Minuten	32
Abb. 14: Fibrinolyseautographie der Lunge 5 Minuten nach Injektion von Benzaron	33
Abb. 15: Fibrinolyseautographie der Lunge 5 Minuten nach Injektion von Aprotinin	34
Abb. 16: Fibrinolyseautographie der Lunge 5 Minuten nach Injektion von Tranexamsäure	34
Abb. 17: Nachweis von Antiplasmin in der Lunge mit Hilfe der sog. Sandwich-Slide-Technik	35
Abb. 18: Negativer Nachweis von Antiplasmin in der Lunge 5 Minuten nach Injektion von Tranexamsäure	36
Abb. 19: Fibrinolyseautographie der Lunge Kontrollgruppe	38

Abb. 20:	Fibrinolyseautographie der Lunge Tranexamsäuregruppe	38
Abb. 21:	Fibrinolyseautographie der Lunge Injektion von Tranexamsäure nach Vorbehandlung mit Benzaron	39
Abb. 22	Statistische Auswertung der fibrino- lyseautographischen Untersuchungen der Lunge nach dem χ^2 -Test	39
Abb. 23:	Fibrinolyseautographie der Vena jugu- laris, Kontrollgruppe	41
Abb. 24:	Fibrinolyseautographie der V.jugularis Tranexamsäuregruppe	41
Abb. 25:	Fibrinolyseautographie der V.jugularis Injektion von Tranexamsäure nach oraler Vorbehandlung mit Benzaron	42
Abb. 26:	Statistische Auswertung der fibrino- lyseautographischen Untersuchungen der V.jugularis nach dem χ^2 -Test	42

VERZEICHNIS DER TABELLEN

Seite

Tab. 1 :	Plasminogenaktivatorgehalt der Lungen verschiedener Tierspezies	4
Tab. 2 :	Plasminogenaktivatorgehalt der ver- schiedenen Organe bei der Ratte	5

1. Bereits im vorigen Jahrhundert wurde von dem franz. Physiologen DASTRE beschrieben, daß sich Blutgerinnsel spontan wieder auflösen können (17). Dieses Phänomen führte schon damals zu der Annahme, daß der Organismus über ein System verfügt, gebildetes Fibrin wieder zu beseitigen, nachdem es seine physiologische Funktion erfüllt hat.

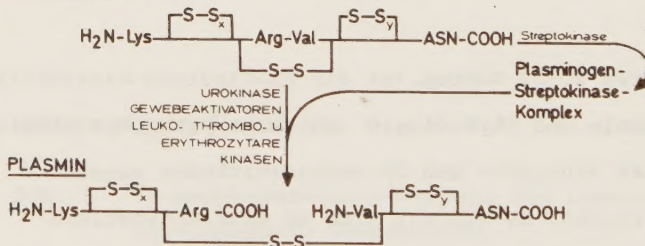
1893 prägte DASTRE die Bezeichnung "Fibrinolyse" für diesen Vorgang (46).

1954 legte ASTRUP sein noch heute gültiges Fibrinolysemodell vor, welches bereits eine enzymatische Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin beschreibt. Die aktive Protease Plasmin vermag Fibrin zu niedermolekularen Spaltprodukten abzubauen (52).

In den letzten 20-30 Jahren ist die Fibrinolyse hinsichtlich ihrer Biochemie und Physiologie und ihrer pathophysiologischen Bedeutung bei Blutungs- und Thrombosezuständen eingehend untersucht worden. Es handelt sich um eine enzymatisch gesteuerte Reaktionskette spezifischer, proteolytischer Vorgänge, in deren Folge das unlösliche Fibrin hydrolytisch gespalten und durch Peptidasen weiter abgebaut wird zu niedermolekularen Spaltprodukten. Die fibrinolytisch wirksamen Enzyme sind normalerweise nicht in aktiver Form im Blut vorhanden, können aber durch spezifische Aktivatoren schnell aktiviert und durch Inhibitoren wieder inaktiviert werden.

Unter physiologischen Bedingungen stehen latent ablaufende Gerinnungs- und Fibrinolysevorgänge in einem dynamischen Gleichgewicht, das bei verschiedenen Krankheitszuständen in der einen oder anderen Richtung verschoben werden kann. Eine gesteigerte fibrinolytische Aktivität wird zum Beispiel bei Schockzuständen beobachtet. Einige Autoren führen dieses auf eine Zerstörung lysosomaler Membranen im Schock zurück, was zur Freisetzung lysosomaler Enzyme führt (8,27,28). Eine Verminderung der Plasminogenaktivatoren in der Vena saphena von Patienten mit Varikosis wird von BARCHIEWITZ und von BRUNETTI beschrieben (6,14).

PLASMINOGEN



MECHANISMUS DER PLASMINOGEN-AKTIVIERUNG DURCH UROKINASE
(nach ROBBINS et al 1967)

Abb. 1: Direkte und indirekte Aktivierung des Plasminogens (50).

Abbildung 1 zeigt die beiden Hauptprinzipien der Aktivierung der Fibrinolyse. Der biochemische Vorgang der Fibrinolyse-aktivierung besteht in einer proteolytischen Spaltung von

Plasminogen an der Arginin-Valin-Bindung durch die Aktivatoren. Es entsteht einer kürzere und eine längere Kette, die über eine Disulfid-Brücke kovalent miteinander in Verbindung stehen. In dieser Form ist das Plasmin proteolytisch aktiv und vermag Fibrinogen und Fibrin in niedermolekulare Spaltprodukte abzubauen (37).

Plasminogen kann durch direkt und indirekt wirkende Aktivatoren aktiviert werden. Durch Urokinase, im Gewebe enthaltene Fibrinolyseaktivatoren und durch leukozytäre Kinasen ist eine direkte Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin möglich (20,32,35).

Die zweite Aktivierungsmöglichkeit ist eine indirekte Reaktion, bei der als Zwischenprodukt ein Aktivator entsteht, der die gleichen katalytischen Eigenschaften wie die körpereigenen Aktivatoren hat. Nach diesem Wirkungsprinzip verläuft die Fibrinolyse durch Streptokinase (32).

Der direkten Fibrinolyseinduktion durch gewebeständige Plasminogenaktivatoren kommt bei allen chirurgischen Eingriffen und traumatischen Zustandsbildern eine besondere Bedeutung zu. Die Verletzung von aktivatorreichen Organen kann zu einer massiven, primären Hyperfibrinolyse führen, ohne daß eine gesteigerte Fibrinbildung vorausgegangen sein muß. Besonders aktivatorreich sind Uterus, Ovar, Niere, Nebenniere, Lunge, Prostata und Venen (33,45). Wenig Aktivatoren findet man in den Testes, der Milz und gar keine in der Leber (1,2,5,19).

Reich an Aktivatoren sind auch zahlreiche Körperflüssigkeiten und Sekrete, wie z.B. Urin, Fruchtwasser, Muttermilch, Tränenflüssigkeit, Speichel und Sperma (20,46,60). Überall dort also, wo Körperflüssigkeiten und Sekrete verschlußgefährdete Röhrensysteme durchfließen, stellt der Organismus hohe Aktivatorkapazitäten bereit (46).

Auf Tab.1 ist der unterschiedliche Gehalt an Plasminogenaktivatoren in den Lungen von verschiedenen Tierspezies ersichtlich.

In Tab.2 sind die verschiedenen Organe der Ratte mit ihrem unterschiedlichen Aktivatorgehalt aufgeführt.

Ratte	232
Maus	213
Pferd	62
Meerschweinchen	15
Katze	14
Hund	14
Rind	0
Schwein	0

Tabelle 1: Konzentration der zellulären Aktivatoren in der Lunge verschiedener Tierspezies. *

Lunge	232
Ovar	61
Nebenniere	60
Hirn	25
Herz	20
Uterus	10

Tabelle 2: Konzentration gewebeständiger Plasminogen-
aktivatoren in verschiedenen Organen der Ratte. *

* (52) Meßwerte als Aktivatoreinheiten nach ASTRUP und
ALBRECHTSEN (1957).

2. ZIELSETZUNG

Pharmaka, die die gewebeständige Fibrinolyse beeinflussen, führen zu einer Verschiebung des unter natürlichen Bedingungen bestehenden Gleichgewichtes zwischen Fibrinbildung und Fibrinauflösung. Die Wirkung von Benzaron auf die Fibrinolyse wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Ziel dieser Arbeit ist es, über Art und Umfang des Einflusses von Benzaron auf die gewebeständige Fibrinolyse, sowie auf die Wirkung von Inhibitoren tierexperimentell Aufschluß zu erhalten.

Bei den verwendeten Fibrinolyseinhibitoren handelt es sich um den natürlichen Proteinaseninhibitor Aprotinin (Trasylol^R) und den synthetischen Fibrinolyseinhibitor Tranexamsäure

(Ugurol^R).

Die Untersuchungen wurden in zwei Serien durchgeführt. Teil I umfaßt einen Kurzzeitversuch, bei dem die Bestimmung der gewebeständigen fibrinolytischen Aktivität nach einmaliger intravenöser Applikation der Pharmaka erfolgte, und Teil II einen Langzeitversuch mit 14-tägiger oraler Applikation von Benzaron und nachfolgender intravenöser Gabe des synthetischen Fibrinolyseinhibitors Ugurol^R.

Diese Untersuchungen wurden an Albinoratten durchgeführt, da das fibrinolytische System dieser Tiere dem des Menschen ähnlich zu sein scheint (18). Die histochemischen Untersuchungen wurden an den Lungen durchgeführt, weil diese einen hohen Gehalt an gewebeständigen Plasminogenaktivatoren aufweisen (7,2). Außerdem wurde die Vena jugularis untersucht, weil die Substanz Benzaron als "Venenwirksame Substanz" angeboten wird.

3. MATERIAL UND METHODIK, TEIL I:

Material:

Männliche Albinoratten, CHbb Thom Biberach, Durchschnittsgewicht 500 g

0,9 %-ige NaCl-Lösung

50 %-ige Äthanol-Lösung

Aprotinin (Trasylol^R; Bayer Leverkusen)

Tranexamsäure (Ugurol^R; Bayer Leverkusen)

Benzaron (Fa.Sanol Monheim)

0,106 M Na-Citrat-Lösung

Ketanest^R (Parke-Davies)

Rompun^R (Bayer Leverkusen)

Topostasin^R (Hoffman La Roche Grenzach), 25 NIH/ml

2 %-ige Human-Fibrinogen-Lösung (Behringwerke Marburg)

PTT Reagenz (Merz und Date München)

Coagulometer (Schnitger Gross)

0,02 M Calciumchlorid CaCl-Lösung

Thrombelastograph (Fa.Hellige Freiburg)

Cryocut (Fa.American Optical Cooperation CORP, Buffalo)

0,06 M KH_2PO_4 -Lösung, pH 7,8 (Fa.Merck Darmstadt)

plasminogenfreie Rinderfibrinogenlösung (Fa.Povit Amsterdam)

Thrombin (Fa.Leo Ballerup Kopenhagen)

Plasmin (Fa.Kabi Stockholm)

Gelatine (Fa.Merck Darmstadt)

3.1 BESCHREIBUNG DER UNTERSUCHTEN SUBSTANZEN

3.1.1 Aprotinin (Trasylol^R)

Der natürliche Proteinaseinhibitor Aprotinin ist ein basisches Polypeptid (24) mit einem Molekulargewicht von 6512, das aus Rinderlungen gewonnen wird.

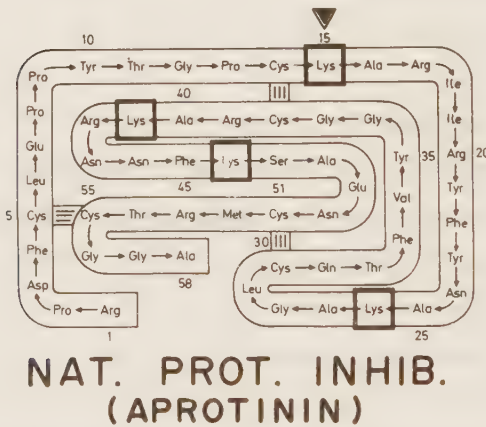


Abb.2 : Strukturformel

1930 wurde Aprotinin von KRAUT, FREI und WERLE in verschiedenen Organen von Rindern - vorwiegend in Pankreas, Carotis und Lunge - gefunden und wenig später wegen seiner Hemmwirkung auf die Enzyme Kallikrein, Trypsin und Chymotrypsin zur Pankreatitistherapie eingesetzt (3,24,59).

Aprotinin hemmt Endoproteinasen wie Trypsin, Chymotrypsin, Kininogenasen, Plasmin, Gewebs- und leukozytäre Proteinase sowie die Aktivierung des endogenen Gerinnungssystems.

Allen diesen Substraten gemeinsam ist ein Serinrest im aktiven Zentrum. Die Hemmwirkung kommt durch die Bildung eines reversiblen inaktiven Enzym-Inhibitor-Komplexes im Verhältnis 1:1 zustande. Der Hemmbezirk des Inhibitormoleküls lagert sich an das aktive Zentrum des Enzymes an. Der Serinrest des Substrates reagiert mit dem Lysin-15-Rest im Hemmbezirk von Aprotinin. Dabei sind Salzbrückenbildung und hydrophobe Effekte für die Wirksamkeit des Inhibitors von besonderer Bedeutung.

Aprotinin wird aufgrund seiner Tertiärstruktur, im Gegensatz zu anderen Inhibitoren, nicht von seinem Substrat angegriffen. Die Hemmwirkung hält daher relativ lange an. Im sauren Medium kann der Inhibitor aus dem Komplex unverändert zurückgewonnen werden (57,59).

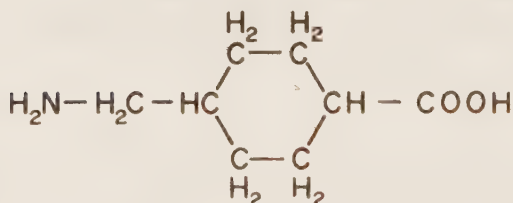
Nach intravenöser Verabreichung von Aprotinin - eine enterale Resorption erfolgt nicht - fällt der Blutspiegel in den ersten 30 Minuten, bis zum Erreichen des Verteilungsgleichgewichtes, bereits auf die Hälfte ab. Dies beruht auf einer raschen Diffusion in die extravasalen Räume. Danach beträgt die Halbwertszeit der Elimination 120-150 Minuten (25). Laut WERLE sind nach 30 Minuten bereits nur noch ca. 4 % der injizierten Aprotininmenge im Blut nachweisbar (58).

Eine starke Anreicherung des Inhibitors findet sich in der Niere, und zwar vorwiegend in den Epithelzellen des proximalen Tubulus. Die Niere spielt auch bei der Elimination von Aprotinin eine zentrale Rolle. Ausgeschieden wird der Inhibitor in inaktiver Form im Harn (30,58).

3.1.2. Tranexamsäure (Ugurol^R)

Tranexamsäure ist ein synthetisches Antifibrinolytikum, das in relativ niedrigen, oral oder parenteral applizierten Dosen einen starken, lang anhaltenden antifibrinolytischen Effekt erzielt.

Chemisch handelt es sich um die Trans-4-(aminomethyl)-cyclohexancarbonsäure, abgekürzt trans-AMCHA.



SYNTH. FIBRINOL. INHIB. (TRANS - AMCHA)

Abb. 3 : Strukturformel

Nur das trans-Isomere ist antifibrinolytisch aktiv (39,44),

und zwar hemmt es die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin. Das aktive Plasmin wird nicht beeinflusst (36,51).

Bringt man plasminogenhaltiges Fibrin in Gegenwart des synthetischen Fibrinolyseinhibitors zur Gerinnung, so konkurriert der Inhibitor mit Plasminogen am Fibrinogenmolekül. Es kommt zum Einschluß des Inhibitors in das gebildete Fibrin.

Plasminogenaktivatoren können nicht mehr wirken; es entsteht ein lyseresistentes Fibringerinnsel (23).

Indikationen für eine Ugurol^R-Therapie sind lokale und generalisierte primär hyperfibrinolytische Blutungen, die z.B. bei Verletzung von aktivatorreichem Gewebe auftreten können (21,26). Trans-AMCHA wird nach oraler Gabe relativ langsam resorbiert, was die Gefahr des Auftretens extremer Blutkonzentrationen weniger wahrscheinlich macht. Auch bleibt der Blutspiegel dadurch relativ lang konstant.

Trans-AMCHA wird unverändert mit dem Harn ausgeschieden.

KALLER bestimmte am Menschen eine Halbwertszeit der Elimination von 80 Minuten (29).

3.1.3. Benzaron

Bei Benzaron handelt es sich chemisch um 2-Äthyl-3(4-methoxy-benzoyl)benzofuran(9).

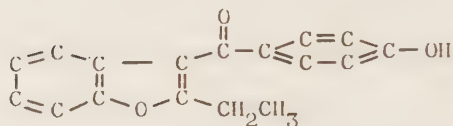


Abb. 4: Strukturformel von Benzaron

Benzaron wird zur Behandlung von Venenerkrankungen, vornehmlich bei Varikosis, eingesetzt. Über die Wirkung auf die Blutgerinnung und auf die Fibrinolyse werden in der Literatur unterschiedliche Angaben gemacht (6,13,22,53). Benzaron wird gut aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert. Bei der Ratte wurde festgestellt, daß sich zwei Stunden nach oraler Applikation noch ca. 90 % der Benzaron-Dosis im Magen-Darm-Kanal befinden, davon 37 % im Magen. Nach 6 Stunden wurden nur noch 35 % im Magen-Darm-Trakt nachgewiesen, davon weniger als 1 % im Magen.

In Blut, Leber, Niere, Herz, Schilddrüse und Haut erreichte die Benzaron-Konzentration beim Menschen nach 2 Stunden ihr Maximum; in Milz, quergestreifter Muskulatur und Fettgewebe nach 6 Stunden und mehr. Die Plasmahalbwertszeit beträgt 5 Stunden. Bei einer Dosis von 100 mg erreicht der Plasmaspiegel ein Maximum von 1-2 µg/ml und zwar 2-4 Stunden nach oraler Gabe.

Die Substanz wird zu 10-20 % im Stuhl ausgeschieden.
70-80 % werden über die ableitenden Harnwege eliminiert,
teilweise unverändert, teilweise glukuronisiert (12).

METHODIK

3.2 Operation der Ratten

Die Ratten wurden nach dem Zufall in vier Gruppen zu je 7 Tieren und eine Kontrollgruppe à 8 Tiere eingeteilt und mit Ketanest (100 mg/kg KGW) und Rompun (12 mg/kg KGW) intramuskulär anästhesiert. Anschließend wurden die Tiere tracheotomiert und intubiert. Die A.carotis und die V.jugularis wurden kanüliert. Über den Venenkatheter erhielten die Tiere folgende Pharmaka:

Gruppe I : 20.000 KIE (Kalikrein-Inhibitor-Einheiten)

Trasylol^R/kg KGW

Gruppe II : 100 mg Ugurol^R/kg KGW

Gruppe III : 10 mg Benzaron /kg KGW, gelöst in
1 ml 50 %-iger Äthanollösung

Gruppe IV (8 Tiere) : 0,5 ml physiologische NaCl-Lösung

Gruppe V : 0,5 ml 50 %-ige Äthanollösung.

1 Minuten nach der Injektion wurde allen Tieren 5 ml Citratblut im Verhältnis 1:10 über den Katheter der A.carotis zur Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) und des Thrombelastogramms (TEG) entnommen.

Unmittelbar nach der Blutentnahme wurde bei den Ratten die Bauch-aorta eröffnet. Die Blutgefäße wurden über die Vena jugularis mit physiologischer NaCl-Lösung blutleer perfundiert, um den Einfluß von im Blut zirkulierenden Aktivatoren und Inhibitoren auszuschließen.

Gleichzeitig wurden die Lungen der Ratten mit Hilfe eines Ambu-Beutels manuell ventiliert. Unmittelbar nach der Perfusion wurden die Lungen und die intakte Vena jugularis der contralateralen Seite entnommen, schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Bei dieser Temperatur bleibt die fibrinolytische Aktivität im Gewebe über Monate erhalten (34).

3.3 Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit

Die Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit ist eine Methode zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der Faktoren des endogenen Gerinnungssystems. Der Gehalt an Kalziumionen und von Plättchenfaktor III wird nicht erfaßt, da diese als Reagenzien im Überschuß zugesetzt werden. Gibt man diese Reagenzien in standardisiertem Überschuß zu Citrablut, so dient die Zeit bis zum Eintritt der Gerinnung als Maß für die Aktivität der Faktoren XII, XI, IX, VIII, X, V, II und I des untersuchten Plasmas. Als Ersatz für den Plättchenfaktor III wird aktiviertes Cephaloplastin-Reagenz verwendet. Hergestellt wird dieses Reagenz aus Kaninchenhirnextrakt unter Zusatz eines speziellen Plasmaaktivators, sowie von Puffer, Stabilisatoren und Konservierungsmittel.

Dem auf 37°C erwärmten Gemisch aus 0,1 ml Plasma und 0,1 ml PTT-Reagenz wird 0,01 ml 0,02 M-CaCl zugegeben. Anschließend wird im Wasserbad von 37°C die Zeit bis zum Einsetzen der Gerinnung gemessen, d.h. die Zeit, bis das Blut beginnt, beim Durchziehen eines feinen Hakens Fäden zu ziehen. Dieser Vorgang wurde von uns mit Hilfe eines Coagulometers (nach Schnitger und Gross) untersucht.

3.4 Thrombelastogramm

Die Thrombelastographie nach HARTERT wird zur Bestimmung der gesamten Gerinnung des Blutes durchgeführt. Hierbei werden photokymographisch die sich während des Gerinnungsvorganges verändernden mechanischen Parameter des entstehenden Gerinnsels registriert. Bestimmt werden die Reaktionszeit "r", die Gerinnselbildungszeit "k" und die maximale Amplitude "Ma". Der Amplitudenverlauf drückt die mechanische Festigkeit des Gerinnsels aus (60).

3.5 Fibrinolyseautographie nach TODD

Zur Bestimmung der Plasminogenaktivatoren im Gewebe wurde die von TODD beschriebene Methode der Fibrinolyseautographie angewandt (54,55).

Nur wenn bei diesen Kontrollpräparaten keine Lyse in Erscheinung tritt, kann angenommen werden, daß für die Lyse in plasminogenhaltigen Filmen die Plasminogenaktivatoren verantwortlich sind (34,56).

Um plasminogenfreies Fibrin zu erhalten, werden die Kontrollplatten vor Auflegen der Gewebeschnitte 60 min lang auf 80°C erhitzt. Dabei wird das im Fibrinfilm enthaltene Plasminogen vollständig zerstört (46,49).

Bei den Versuchen wurde 2 %-iges Humanfibrinogen verwendet, mit einem Plasminogengehalt von 10 mg %. Dieser Gehalt an Plasminogen muß konstant sein, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten (40).

5.2 Arbeitsgang der Fibrinolyseautographie

A. Ansetzen der Thrombinlösung

Topostasinpulver mit 3000 NIH (National Institute of Health-Unit) wird zunächst in je 10 ml aqua dest. und Puffer (pH 7.4) aufgelöst und anschließend mit Pufferlösung auf 25 NIH pro ml verdünnt.

Ein NIH ist die Thrombinmenge, die bei 25°C 1 ml einer standardisierten Fibrinogenlösung in 45 sec. koaguliert (60).

B. Ansetzen der Fibrinogenlösungen

Um eine 2 %-ige Lösung zu erhalten, wird 1 g Humanfibrinogen in 50 ml physiologischer NaCl-Lösung gelöst.

C. Vorbereitung der Objektträger

Die mit der Nummer der Ratten und der vorgesehenen Inkubationszeit markierten Objektträger werden mehrmals mit

Aceton gereinigt. Anschließend wird auf jede Platte 0,1 ml 2 %-iges Fibrinogen und 0,1 ml Topostasin (entsprechend 2,5 NIH Thrombin) aufgetropft und durch Schwenken des Objektträgers gemischt. Bis zum Erstarren des ca. 0,2 mm dicken Fibrinfilmes wird der Objektträger auf einem Nivellier-Tisch gelagert. Danach müssen sie noch etwa 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer liegen bleiben, um eine Stabilisierung des Fibringerinnsels zu erreichen (4,34).

D. Aufbringen der Gewebeschnitte

Die mit dem Cryocut angefertigten 6 μ dicken Gewebeschnitte werden vom Cryocutmesser durch direkten Kontakt zwischen Gewebe und Fibrinfilmen auf die Objektträger übertragen. Dabei ist es wichtig, daß die Schnittfläche möglichst konstant ist, da mit zunehmender Dicke die Stärke der fibrinolytischen Aktivität abnimmt. Dieser Effekt erklärt sich dadurch, daß mit dem Schnitt Zellmembranen eröffnet und intrazelluläre Enzyme freigesetzt werden, die mit dem Fibrinfilmen in Wechselwirkung treten. Bei dickeren Schnitten liegen mehr intakte Zellen zwischen der Schnittoberfläche und dem Fibrinfilmen, so daß ein Teil der vorhandenen Enzyme nicht auf den Fibrinfilmen einwirken kann (48).

E. Inkubation

In einer feuchten Kammer werden die Präparate auf den plasminogenhaltigen Fibrinplatten 30, 60 und 90 min lang

bei 37°C inkubiert. Die plasminogenfreien Kontrollplatten werden 60 min lang bei 37°C inkubiert.

F. Fixierung

Nach dem Ende der Inkubationszeit werden die Präparate für 60 min in ein 10 %-iges Formalinbad gebracht und anschließend zweimal in aqua dest. gespült.

G. Färbung

Die Präparate werden 60 min lang in Alaun-Hämatoxilin gefärbt und anschließend mehrmals kurz mit Leitungswasser gespült. Die Gegenfärbung erfolgt durch Eintauchen in 0,5 %-ige Eosin-Lösung während 1 min und nachfolgender kurzer Spülung mit Leitungswasser. In einer steigenden Alkoholreihe (70-96 %) werden die Präparate entwässert.

Nach einer Farbaufhellung der Präparate mit Xylol werden sie mit Deckgläsern versehen.

Arbeitsgang der Fibrinolyseautographie

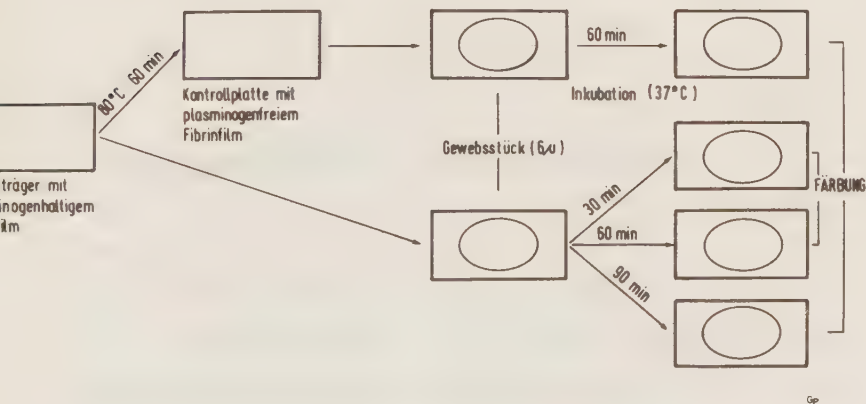


Abb. 6 : Arbeitsgang der Fibrinolyseautographie

3.5.3 Methode der Auswertung der Befunde

Die fertigen Präparate werden mikroskopisch ausgewertet. Mit Hilfe der Einteilung in Lysegrade nach PANDOLPHI läßt sich eine semiquantitative Aussage über die fibrinolytische Aktivität im Gewebe machen(47).

Mit Lysegrad I bezeichnet man den Zustand , bei dem der Fibrinfilm nur angedaut ist, erkennbar als leichte Farbaufhellung im Fibrinfilm.

Bei Lysegrad II sind die Lysehöfe größer und der Fibrinfilm ist bis auf den Grund aufgelöst.

Bei Lysegrad III kommt es zu einer massiven Auflösung des Fibrinfilms. Die Lyseareale konfluieren und Gewebeteile schwimmen ab, so daß die Gewebestrukturen stellenweise kaum noch zu erkennen sind.

3.6. INHIBITORNACHWEIS NACH NOORDHOEK-HEGT

3.6.1 Prinzip der Methode des Nachweises von gewebeständigen Plasmininhibitoren

Die gewebeständigen Plasmininhibitoren werden mit Hilfe der Sandwich-Slide-Methode nach NOORDHOEK-HEGT bestimmt (10,42,43). 16 μ dicke Cryocutschnitte des zu untersuchenden Gewebes werden mit einem plasminogenfreien Fibrinfilm bedeckt und anschließend 60 min lang in einer feuchten Kammer (100 % relative Luftfeuchtigkeit) inkubiert. In dieser Zeit können im Gewebe vorhandene Inhibitoren in den Fibrinfilm diffundieren. Auf den Fibrinfilm wird anschließend im Bereich

über dem Gewebeschnitt eine standardisierte Menge Plasmin in Form eines Plasmin-Gelatine Blocks aufgebracht. Daraufhin werden die Präparate bei 37°C wiederum bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit unterschiedlich lange inkubiert, um das Plasmin auf den Fibrinfilmen einwirken zu lassen.

Nach Ablauf der festgesetzten Inkubationszeiten wird der Vorgang mit Formaldehyd-Lösung gestoppt. 15 min. lang werden die Präparate mit Formaldehyd fixiert, anschließend 15 min lang gewässert und 12 h lang mit Haemalaun-Eosin gefärbt.

Überall dort, wo keine Plasmininhibitoren vorhanden sind, wird der Fibrinfilmen vom Plasmin aufgelöst, und zwar innerhalb der konstanten Zeit von 100 min. Bei Anwesenheit von Inhibitoren ist dieser Vorgang, je nach Inhibitormenge, zeitlich verzögert. Die Dauer der Verzögerung kann somit als Maß für die Inhibitoraktivität angesehen werden.

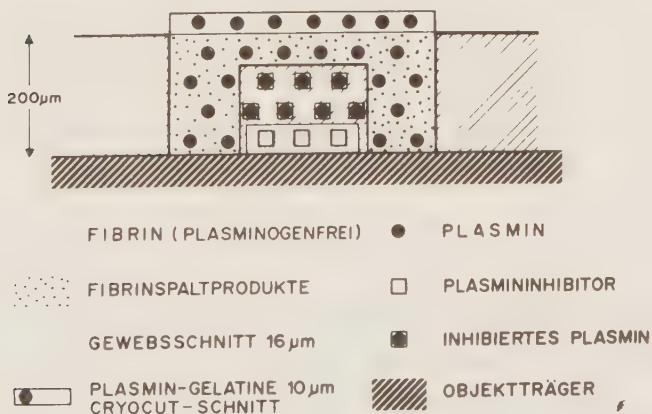


Abb.7: Schema des Reaktionsablaufes bei der Sandwich-Slide-Technik(Das Schema wurde freundlicherweise von Prof. Dr.med.G.Blümel zur Verfügung gestellt).

3.6.2 Arbeitsgang

A. Vorbereitung der Objektträger

Die mehrfach mit Aceton gereinigten , mit Identifizierungsnummer und vorgesehener Inkubationszeit markierten Objektträger werden in eine feuchte Kammer (100 % relative Luftfeuchtigkeit) eingelegt. Die im Cryocut gewonnenen 16 μ dicken Gewebeschnitte werden auf die Objektträger aufgebracht und für 30 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert.

B. Ansetzen der plasminogenfreien Fibrinogenlösung

7 g Rinderfibrinogen werden in 100 ml KH_2PO_4 Pufferlösung (pH 7.8) gelöst, so daß eine 0,7 %-ige Fibrinogenlösung entsteht .

C. Ansetzen des plasminogenfreien Thrombins

5000 NIH Thrombinum purum werden in 5 ml physiologischer NaCl-Lösung gelöst. Je 40 NIH werden in Plastikröhrchen abgefüllt und eingefroren. In diesem Zustand behält das Thrombin ca. 1 Jahr seine volle Wirksamkeit. Vor Gebrauch werden 40 NIH in 10 ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung gelöst (4 NIH pro ml).

D. Überdeckung mit plasminogenfreiem Fibrin film

Zur Überdeckung der Gewebeschnitte mit einem fibrinogenfreien Fibrin film wird jeweils ein Objektträger aus der feuchten Kammer herausgenommen, 100 μ l plasminogenfreies

Rinderfibrinogen werden aufgetropft und verteilt; anschließend werden 100 μ l plasminogenfreies Thrombin dazugegeben.

Beide Flüssigkeiten werden durch Schwenken des Objektträgers homogen verteilt.

E. Inkubation (1.)

Die beschichteten Präparate kommen zurück in die feuchte Kammer, wo sie bei 4°C eine Stunde lang inkubiert werden. Während dieser Zeit diffundieren im Gewebe enthaltene Inhibitoren in den Fibrinfilm.

F. Aufbringen von Plasmin

In Gelatine eingefrorenes Plasmin (1,5 Kaseineinheiten pro 1 ml 15 %-ige Gelatine) wird bei -30°C 10 μ dick geschnitten und mit einer Dumont-Pinzette auf den Fibrinfilm jeder Platte im Gebiet über dem Gewebeschnitt aufgebracht.

G. Inkubation (2.)

Die Objektträger kommen sofort zurück in die feuchte Kammer, wo sie bei 37°C über festgesetzte Zeiträume hinweg (100, 120, 140, 160 und 180 min) inkubiert werden. Während dieser Zeiten kann das Plasmin in den Fibrinfilm einwirken und ihn dort auflösen, wo keine Inhibitoren dieser Lyse entgegenwirken. Zur Ermittlung der Inhibitoraktivität werden den verschiedenen Inkubationszeiten Ziffern von 1-5 zugeordnet.

100 min	Inkubationszeit	entsprechen	dem	Inhibitionsgrad	I
120 min	"	"	"	"	II
140 min	"	"	"	"	etc.

H. Fixierung und Färbung der Präparate

Die Fixierung der Präparate erfolgt in 10 %-iger Formalinlösung und die Färbung mit Hämalaun-Eosin.

Arbeitsgang des Inhibitornachweises

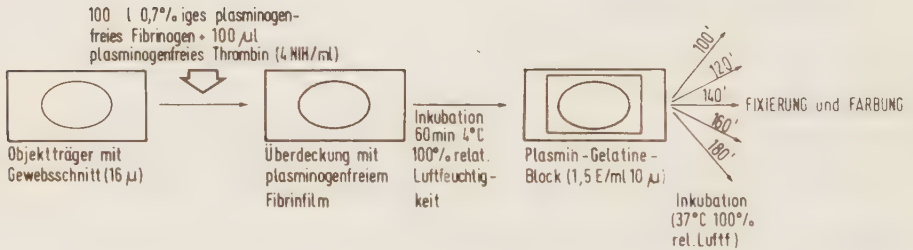


Abb. 8 : Arbeitsgang des Inhibitornachweises

3.6.3 Auswertung der Befunde

Die Auswertung der fertigen Präparate erfolgt unter dem Lichtmikroskop. Dabei wird der Grad der Inhibitoraktivität mit der Ziffer gekennzeichnet, die der längsten Inkubationszeit zugeordnet ist, bei der noch keine Lyse des Fibrinfilms zu erkennen ist.

Inhibitionsgrad 0 liegt dann vor, wenn über dem Gewebe nach 100 min Inkubation bereits kein Fibrinfilm mehr erhalten ist. Sind Inhibitoren vorhanden, so erkennt man dies an dem über dem Gewebe erhaltenen, rotgefärbten Fibrinfilm, während das Fibrin außerhalb des Gewebebereiches lysiert ist.

4. MATERIAL UND METHODIK, Teil II:

Material:

Männliche Albinoratten, Chbb Thom Biberach, Durchschnittsgewicht 500 g

0,9 %-ige NaCl-Lösung

Tranexamsäure (Ugurol^R, Bayer Leverkusen)

Benzaron (Fa. Sanol Monheim)

Ketanest^R (Parke-Davies)

Rompun^R (Bayer Leverkusen)

Topostasin^R (Hoffmann La Roche) 25 NIH/ml

2 %-ige Human-Fibrinogenlösung (Behringwerke Marburg)

Cryocut (Fa. American Optical Corp., Buffalo)

Methodik

Die Langzeitversuche wurden in zwei Serien durchgeführt. In der 1. Serie wurden 14 Ratten nach dem Zufall in 2 Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 erhielt während einer Zeitdauer von 14 Tagen täglich 100 mg Benzaron / kg KGW per os. Die pulverförmige Substanz wurde in 10 g gehacktes Rindfleisch gemengt. Erst nach dessen Verzehr erhielten die Ratten die gewohnte Fütterung mit Pellets. Der zweiten Gruppe wurde während der gleichen Zeitdauer die gleiche Menge gehacktes Rindfleisch ohne Wirksubstanz verabreicht. Während der Versuchsdauer wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten. Nach Ablauf des Versuchs wurden alle Tiere mit Ketanest (100 mg/kg KGW) und Rompun^R (12 mg/kg KGW) intramuskulär narkotisiert. Die Vena jugularis wurde kanüliert und die Trachea intubiert. Über die V. jugularis wurden nach Eröffnung der Bauchaorta die Lunge und Blutgefäße wie unter Teil 1 beschreiben, mit physiologischer NaCl-Lösung leerperfundiert. Gleichzeitig wurden die Tiere beatmet. Die Entnahme des Lungengewebes und der Vena jugularis der contralateralen Seite erfolgte ebenfalls wie unter Teil I beschrieben.

In der 2. Langzeitversuchsreihe wurden 21 Ratten in 3 Gruppen eingeteilt. 7 Tiere erhielten wiederum 14 Tage lang 100 mg Benzaron/kg KGW per os, wie im 1. Langzeitversuch beschrieben.

Die beiden anderen Gruppen erhielten während des gleichen Zeitraumes die entsprechende Menge gehacktes Rindfleisch ohne Wirksubstanz.

Nach der 14-tägigen Versuchsdauer wurden die Tiere wie beim 1. Langzeitversuch narkotisiert und kanüliert. Die 7 mit Benzaron gefütterten Tiere und 7 Ratten ohne Benzaronbehandlung erhielten je 100 mg Uguro1/kg KGW über den Venenkatheter intravenös. Die zweite, nicht mit Wirksubstanz behandelte Gruppe erhielt 0,5 ml physiologische NaCl-Lösung intravenös.

5 Minuten nach der Injektion erfolgte bei allen Tieren die Perfusion mit NaCl-Lösung und die Entnahme der Lungen und der contralateralen Vena jugularis , wie unter Teil I beschrieben. Die Untersuchung der Gewebeproben mit Hilfe der Fibrinolyseautographie nach TODD erfolgte ebenfalls wie unter Teil I aufgezeigt wurde.

5. ERGEBNISSE

Teil I:

5.1. Die partielle Thromboplastinzeit

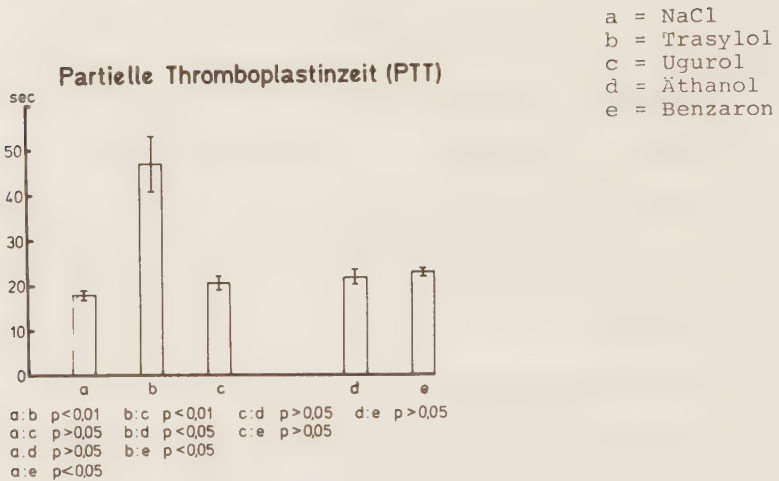


Abb. 9 : Statistische Auswertung der partiellen Thromboplastinzeit mit Hilfe des ungepaarten Student-t-Testes

Die PTT der Trasylolgruppe ist gegenüber der Kontroll- und Ugurolgruppe hochsignifikant verlängert. Im Vergleich zur Benzaron- und Äthanolgruppe ist die PTT-Verlängerung der Trasylolgruppe signifikant.

5.2. Thrombelastographie

Thrombelastogramm r-Zeit

a = NaCl
b = Trasylol
c = Ugurol
d = Äthanol
e = Benzaron

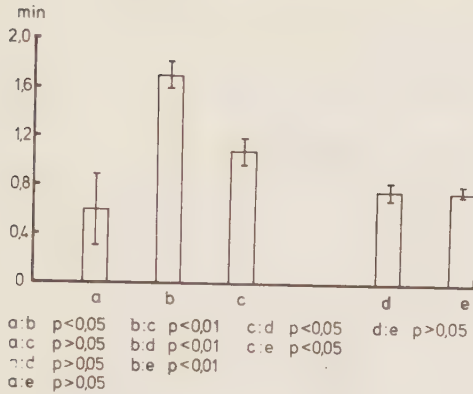


Abb.10 : Statistische Auswertung der Reaktionszeit "r"
mit Hilfe des ungepaarten Student-t-Testes

Die Befunde der r-Zeit im Thrombelastogramm korrelieren mit der partiellen Thromboplastinzeit. Die Werte der Trasylolgruppe sind gegenüber der Kontrolle signifikant und gegenüber der Ugurol-, Benzaron- und Äthanolgruppe hochsignifikant verlängert.

a = NaCl
b = Trasylol
c = Ugurol
d = Äthanol
e = Benzaron

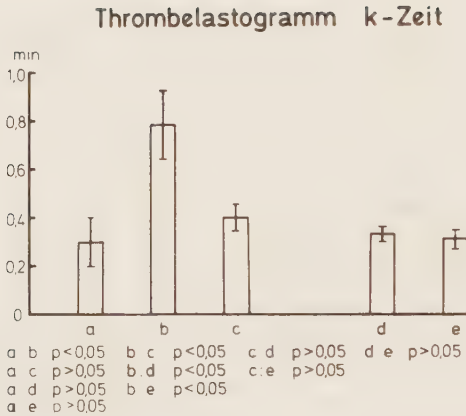


Abb. 11: Statistische Auswertung der Gerinnselbildungszeit "k" mit Hilfe des ungepaarten Student-t-Testes

Auch die Gerinnselbildungszeit "k" korreliert mit der partiellen Thromboplastinzeit und der r-Zeit des Thrombelastogramms.

Die Werte der Trasylolgruppe sind gegenüber der Kontroll-, Ugurol-, Benzaron- und Äthanolgruppe signifikant verlängert.

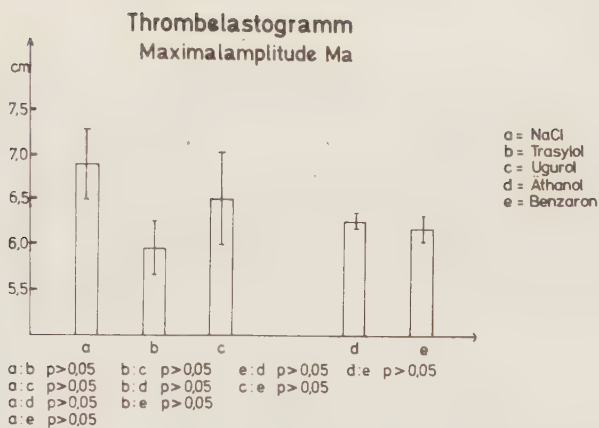


Abb. 12: Statistische Auswertung der Maximalamplitude "Ma"
mit Hilfe des ungepaarten Student-t-Testes

Die Maximalamplitude wurde durch die verschiedenen
Substanzen nicht beeinflusst.

5.3. Fibrinolyseautographie

		Lysegrad						
		Substanz	(I)	I	I-II	II	II-III	III
30 min	UGUROL®	2	5	0	0	0	0	n=7
	TRASYLOL®	0	6	0	0	0	0	n=6
	phys. NaCl	0	3	4	0	0	0	n=7
60 min	UGUROL®	0	1	4	0	1	0	n=6
	TRASYLOL®	0	0	0	0	4	2	n=6
	phys. NaCl	0	0	0	1	1	6	n=8
90 min	UGUROL®	0	0	0	0	3	4	n=7
	TRASYLOL®	0	0	0	0	0	6	n=6
	phys. NaCl	0	0	0	0	1	7	n=8

Abb. 13: Aufzeichnung der Lysegrade der Lungen nach einer Inkubationszeit von 30,60 und 90 Minuten der Trasylol-, Ugurol- und NaCl-Gruppe.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß nach 30-minütiger Inkubation alle Präparate eine beginnende Lyse zeigen, die in der Kontrollgruppe wenig stärker ist als in der Trasylolgruppe, in dieser wiederum geringfügig deutlicher als in der Ugurolgruppe. Nach 60 Minuten Inkubation werden die Unterschiede zwischen den Gruppen deutlich. Während in der Trasylol- und Kontrollgruppe die Lyse bereits soweit fortgeschritten ist, daß Gewebestrukturen zum Teil nicht mehr zu erkennen sind (Lysegrade II-III), ist die fibrinolytische Aktivität in der Ugurolgruppe deutlich vermindert (Lysegrade I und I-II).

Nach 90 Minuten zeigen alle Gruppen vorwiegend Lysegrade III.

Die fibrinolytische Aktivität der mit Benzaron behandelten Tiere verhält sich zu allen Zeiten entsprechend der Kontrollgruppe.

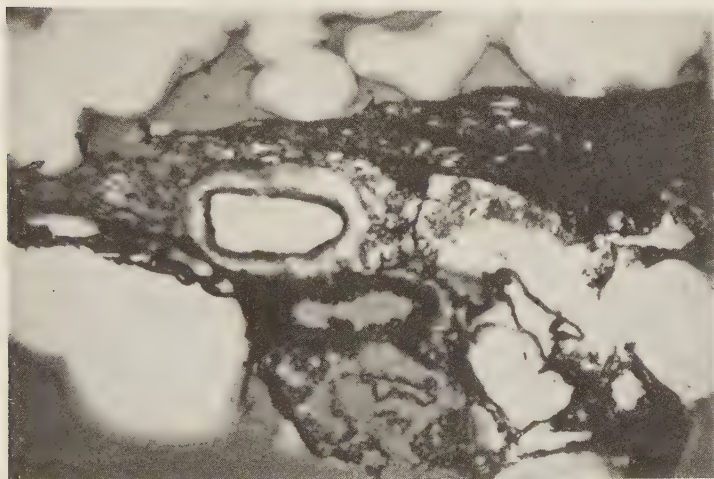


Abb. 14: Fibrinolyseautographie der Lunge 5 Minuten nach intravenöser Gabe von Benzaron, Lysegrad II-III, Inkubationszeit von 60 Minuten, Vergrößerung $\times 7,5$

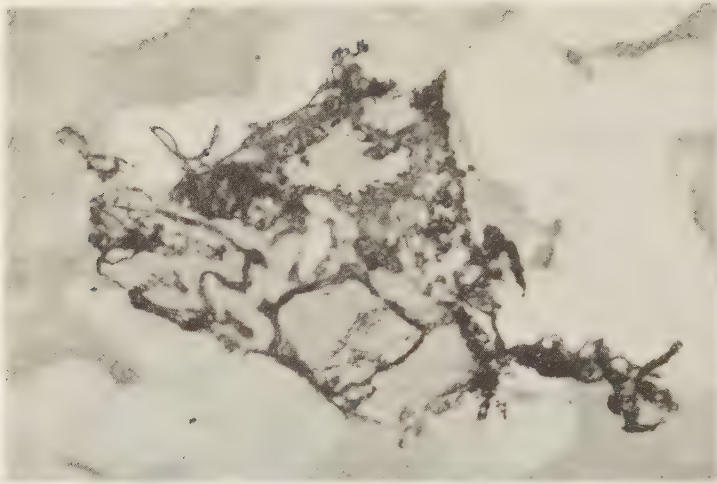


Abb. 15: Fibrinolyseautographie der Lunge 5 Minuten nach i.v. Gabe von Aprotinin, Lysegrad II-III, Inkubationszeit 60 Minuten, Vergrößerung x 7,5

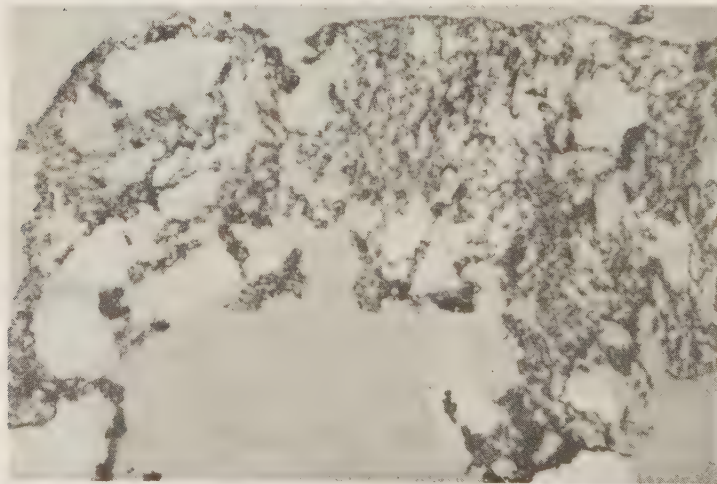


Abb. 16: Fibrinolyseautographie der Lunge, 5 Minuten nach i.v. Gabe von Tränexamsäure, Lysegrad I-II, Inkubationszeit 60 Minuten, Vergrößerung x 7,5

5.4. Nachweis von Plasmininhibitoren im Gewebe

Mit Hilfe der sog. Sandwich-Slide-Technik kann Trasylol im Gewebe nachgewiesen werden. Der Fibrinfilmm ist über dem Lungengewebe vollständig erhalten, was durch die Präsenz von Antiplasmin erklärt werden kann.

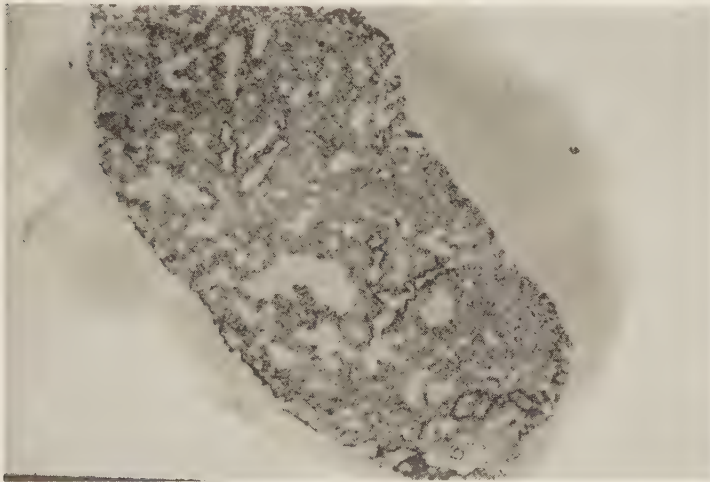


Abb. 17: Nachweis von Antiplasmin in der Lunge mit Hilfe der Sandwich-Slide-Technik nach Injektion von Aprotinin (Trasylol^R)

Bei den Lungen der Ugurologruppe ist der Nachweis von Plasmininhibitoren im Gewebe negativ. Nach einer Inkubationszeit von 100 Minuten ist der über dem Lungengewebe ausgebreitete Fibrinfilmm vollständig aufgelöst.

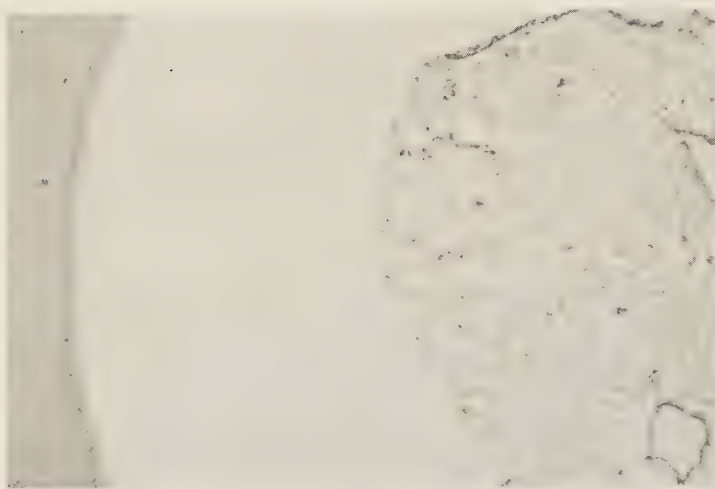


Abb. 18: Negativer Nachweis von Antiplasmin in der Lunge
nach Injektion von Tranexamsäure (Ugurol^R)

In den Lungen der Benzarongruppe kann ebenfalls kein
Antiplasmin nachgewiesen werden.

6. ERGEBNISSE

Teil II

Die Lungen und die Vv.jugulares der mit Benzaron gefütter-
ten Tiere des ersten Langzeitversuches unterscheiden sich
hinsichtlich ihrer fibrinolytischen Aktivität nicht von
denen der Kontrolltiere.

6.1 Fibrinolyseautographie der Lunge

Die Lungen der Kontrolltiere des 2.Langzeitversuches zeigen alle bereits nach 15 Minuten Inkubationszeit eine leichte fibrinolytische Aktivität. In der mit Placebo vorbehandelten Uguroolgruppe sind dagegen in keinem Fall Lysezeichen zu erkennen. In der mit Benzaron vorbehandelten Gruppe ist trotz der intravenösen Gabe von Ugurool bei 3 von 7 Tieren eine fibrinolytische Aktivität der Lungen nachweisbar (Lysegrad (I)).

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten ist die fibrinolytische Aktivität des Lungengewebes in der Uguroolgruppe hochsignifikant vermindert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Während in der Kontrollgruppe der Fibrinfilm unter dem Lungengewebe in allen Fällen deutlich angedaut ist (Lysegrad I), sind in der Uguroolgruppe nur Spuren beginnender Lyse zu erkennen (Lysegrad (I)). Auch nach Inkubationszeiten von 45 und 90 Minuten ist die Fibrinolysehemmung in der Uguroolgruppe (Lysegrad I, bzw. II-III) noch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe, wo nach 45 bzw. 90 minütiger Inkubation Lysegrade II bzw. III beobachtet werden.

In der mit Benzaron vorbehandelten Gruppe zeigen die Lungen trotz Uguroolinjektion nach den verschiedenen Inkubationszeiten eine deutliche fibrinolytische Aktivität, die sich nur unwesentlich von derjenigen der Kontrollgruppe unterscheidet.

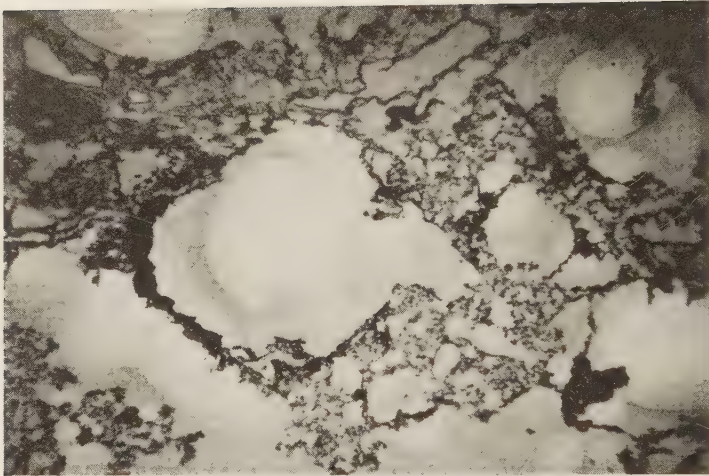


Abb. 19 : Fibrinolyseautographie der Lunge.Kontrollgruppe
Inkubationszeit 45 Minuten, Lysegrad II,
Vergrößerung x 10.

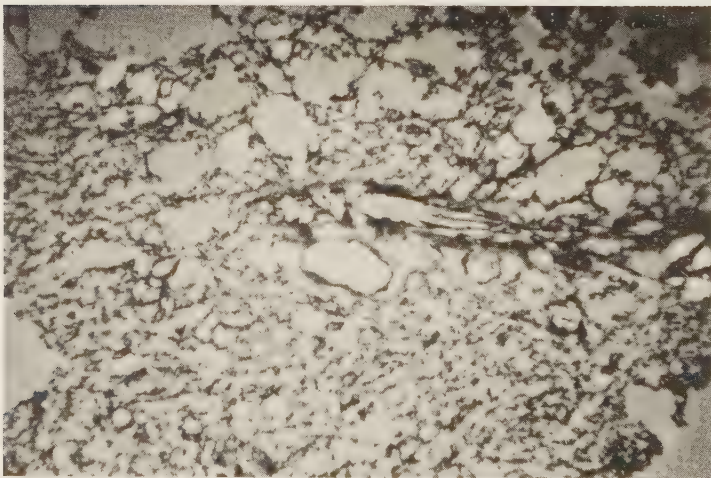


Abb. 20: Fibrinolyseautographie der Lunge,Tranexamsäure-
gruppe, Inkubationszeit 45 Minuten, Lysegrad I
Vergrößerung x 10.

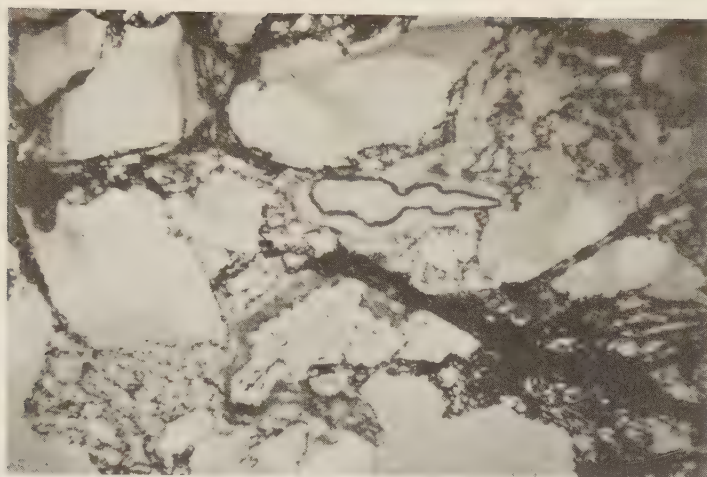


Abb. 21: Fibrinolyseautographie der Lunge, Injektion von Tranexamsäure nach zweiwöchiger oraler Vorbehandlung mit Benzaron, Inkubationszeit 45 Minuten, Lysegrad II Vergrößerung x 10

FIBRINOLYSEAUTOGRAPHIE DER LUNGE

	Kontrolle	trans-Amcha	Benzaron trans-Amcha	45' bzw 90 min Inkubationszeit
Kontrolle	—	$p < 0.05$	$p > 0.05$	
trans-Amcha	$p < 0.01$	—	$p > 0.05$	
Benzaron trans-Amcha	$p > 0.05$	$p > 0.05$	—	
30 min Inkubationszeit				

Abb. 22: Statistische Auswertung der fibrinolyseautographischen Untersuchungen der Lunge nach dem χ^2 -Test.

6.2. Fibrinolyseautographie der Vena jugularis

Die fibrinolyseautographischen Untersuchungen der Venae jugulares sind denen der Lungen sehr ähnlich. Die fibrinolytische Aktivität der Venenwände ist im Vergleich zu den Lungen generell etwas vermindert, so daß Inkubationszeiten bis zu 180 Minuten notwendig sind. Nach 120 Minuten Inkubationszeit sind bei den Venen der Ugurolgruppe nur Lysegrade I und I-II zu finden, während es bei den Tieren, die 14 Tage lang Benzaron erhalten hatten, trotz Gabe des synthetischen Antifibrinolytikums Ugurol zu Lysegraden II und II-III kommt. Dieser Unterschied ist nach der Signifikanzberechnung mit Hilfe des χ^2 - Testes hochsignifikant.

Auch nach 180 Minuten Inkubationsdauer ist die fibrinolytische Aktivität der Vena jugularis der Ugurolgruppe signifikant vermindert (Lysegrad II-III) gegenüber der Kontrollgruppe und gegenüber der mit Benzaron vorbehandelten Ugurolgruppe, wo der Fibrinfilmbildung unter den Präparaten im Mittel Lysegrad III zeigt.

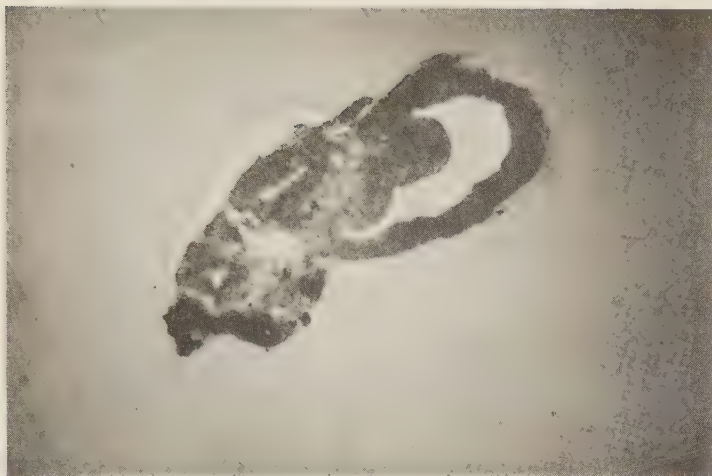


Abb. 23 : Fibrinolyseautographie der Vena jugularis,
Kontrollgruppe, Inkubationszeit 90 Minuten,
Lysegrad II, Vergrößerung x 10.



Abb. 24 : Fibrinolyseautographie der Vena jugularis, Tran-
examsäuregruppe, Inkubationszeit 90 Minuten,
Lysegrad I, Vergrößerung x 10

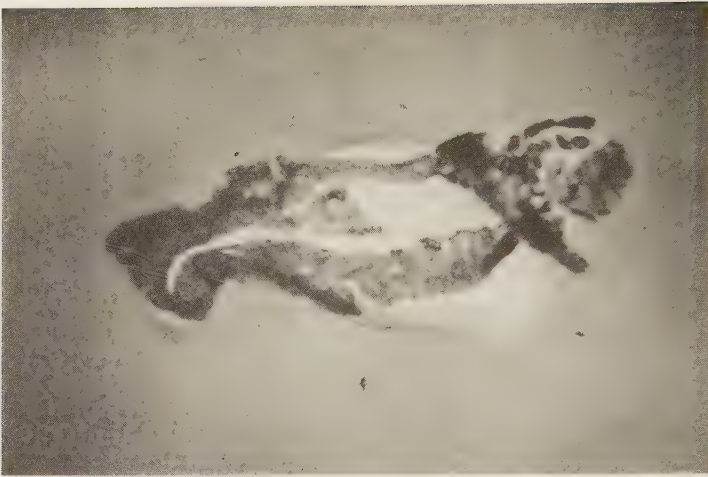


Abb. 25 : Fibrinolyseautographie der Vena jugularis, Injektion von Tranexamsäure nach zweiwöchiger oraler Vorbehandlung mit Benzaron, Inkubationszeit 90 Minuten, Lysegrad II, Vergrößerung x 10.

FIBRINOLYSEAUTOGRAFIE DER VENA JUGULARIS

	Kontrolle	trans-Amcha	Benzaron trans-Amcha	180 min Inkubationszeit
Kontrolle	—	$p < 0.05$	$p > 0.05$	
trans-Amcha	$p < 0.05$	—	$p < 0.05$	
Benzaron trans-Amcha	$p > 0.05$	$p < 0.01$	—	
120 min Inkubationszeit				

Abb. 26 : Statistische Auswertung der fibrinolyseautographischen Untersuchungen der Vena jugularis nach dem χ^2 - Test.

Bei den Kontrollpräparaten mit plasminogenfreiem Fibrin-film kam es zu keiner Lyse. Eine unspezifische Proteasen-wirkung kann also ausgeschlossen werden.

7. DISKUSSION

Ausgehend von Angaben von BARCHEWITZ und GOETHALS, die bei Patienten mit Varikosis einen verminderten Gehalt an Plasminogenaktivatoren in der Wand der Vena saphena magna nachweisen konnten, und eine günstige Beeinflussung durch Benzaron (Fragivix^R) fanden (6,22), sollte gezeigt werden, ob Benzaron auch nach intravenöser Gabe und unter physiologischen Bedingungen die gewebeständigen Plasminogenaktivatoren beeinflusst.

Außerdem sollte untersucht werden, ob die intravenöse Gabe von Benzaron eine Wirkung auf die gewebeständigen Plasmininhibitoren hat.

In unseren Kurzzeitversuchen konnten wir durch Benzaron keinen Effekt auf gewebeständige Fibrinolyseaktivatoren und - Inhibitoren nachweisen, wobei bedacht werden muß, daß wir die Substanz intravenös verabreicht und das Gewebe bereits 5 Minuten nach der Applikation entnommen haben.

Außerdem mußte die Substanz in unphysiologischer Äthanol-lösung appliziert werden, was möglicherweise die Wirkung beeinflußt.

Aus dieser Überlegung heraus wurde der erste Langzeitversuch mit 14-tägiger oraler Gabe von Benzaron angesetzt. Da auch hier keine Wirkung auf die fibrinolytische Aktivität des Gewebes nachweisbar war, kann man davon ausgehen, daß eine Steigerung der fibrinolytischen Aktivität über das physiologische Maß hinaus durch Benzaron nicht möglich ist.

Die Untersuchung von Plasminogenaktivatoren im Gewebe nach intravenöser Gabe von Antifibrinolytika im ersten Teil der Arbeit war notwendig, um-im Rahmen eines zweiten Langzeitversuches mit Benzaron-den Plasminogenaktivator experimentell blockieren zu können. Es konnte der unterschiedliche Einfluß von natürlichen Proteinaseinhibitoren und synthetischen Antifibrinolytika auf den Plasminogenaktivator aufgezeigt werden. Es kommt zu einer deutlichen Hemmung der gewebeständigen Plasminogenaktivatoren durch den synthetischen Fibrinolyseinhibitor Ugurol, nicht jedoch durch den natürlichen Proteinaseinhibitor Trasylol. Im Gegensatz dazu ist Antiplasmin nur nach Trasylolinjektion, nicht nach Ugurolgabe nachweisbar. Dies deutet auf die unterschiedlichen Angriffspunkte der beiden Inhibitoren hin. Während Ugurol Plasmin nicht inhibiert, sondern den Vorgang der Fibrinolyseaktivierung durch die gewebeständigen Plasmi-

nogenaktivatoren blockiert, wirkt Trasylol als direkter Plasmininhibitor und ist als solcher im Gewebe nachweisbar (25,36,51).

Über den Einfluß von Benzaron auf die Blutgerinnung werden in der Literatur unterschiedliche Angaben gemacht. TILSNER konnte in vitro und in vivo keine Beeinflussung der partiellen Thromboplastinzeit und der Parameter des Thrombelastogramms nachweisen (53). BROTELLE hingegen fand beim Hund 5 und 10 Minuten nach Injektion von 10 mg/kg KGW Benzaron Verlängerungen der r- und k-Zeit im Thrombelastogramm (13). Aufgrund dieser widersprüchlichen Aussagen haben wir im Rahmen des Kurzzeitversuches neben den histochemischen Untersuchungen des Gewebes auch die partielle Thromboplastinzeit und die Werte des Thrombelastogramms bestimmt. Unsere Ergebnisse unterstützen die Befunde von TILSNER. Wir fanden in der Benzarongruppe keine Veränderung des endogenen Gerinnungssystems und der Gesamtgerinnung.

Die Verlängerung der partiellen Thromboplastinzeit und der r- und k-Zeiten im Thrombelastogramm durch Trasylol beruhen nicht auf einer Antithrombinwirkung von Aprotinin, sondern sind als indirekte Reaktion zu verstehen (38). Der Faktor XII a spielt im Rahmen der Blutgerinnung und Fibrinolyse eine wesentliche Rolle; er aktiviert nicht nur das endogene Gerinnungssystem durch Oberflächenkontakt, sondern wirkt auch auf die Entstehung von Plasmin und Plasma-

kallikrein. Plasmin und Plasmakallikrein wiederum bewirken unter anderem über eine positive Rückkopplung eine weitere Aktivierung des endogenen Gerinnungssystems. Da die beiden Proteasen Plasmin und Plasmakallikrein von Trasylol gehemmt werden, sind die gefundenen Werte der verlängerten partiellen Thromboplastinzeit und der r- und k-Zeiten im Thrombelastogramm verständlich (15,16,31,61).

Die Erkenntnis aus dem Kurzzeitversuch, daß durch Ugurol die im Gewebe enthaltene fibrinolytische Aktivität blockiert werden kann, wurde dem 2. Langzeitversuch zu Grunde gelegt. Wir konnten nachweisen, daß Benzaron einer Verminderung der gewebeständigen fibrinolytischen Aktivität entgegenwirkt. Die Wirkung des synthetischen Fibrinolyseinhibitors Ugurol wurde durch Benzaron aufgehoben. Dieser Befund ist für die Anwendung von Benzaron bei allen Krankheitszuständen, die mit einer Verminderung der gewebeständigen Plasminogen-aktivatoren einhergehen, von Bedeutung. Bei Venenerkrankungen mit verminderter fibrinolytischer Aktivität des Gewebes kann durch diese Wirkung die Thrombosegefahr herabgesetzt werden.

8. ZUSAMMENFASSUNG

In einem Kurzzeitversuch wurde tierexperimentell der Einfluß von 2 Antifibrinolytika (Aprotinin und Tranexamsäure) und von Benzaron - einer in der Humanmedizin zur Behandlung von Varikosispatienten verwendeten Substanz - auf die Blutgerinnung und die im Gewebe enthaltenen Plasminogenaktivatoren und Plasmininhibitoren untersucht. Die Substanzen wurden Albinoratten intravenös appliziert. 5 Minuten nach der Injektion wurden Blutproben für die Bestimmung des Thrombelastogramms und der partiellen Thromboplastinzeit entnommen. Die Lungen und Venae jugulares wurden nach Leerperfusion mit physiologischer NaCl-Lösung exzidiert und mit Hilfe der Fibrinolyseautographie nach TODD und dem Antiplasminnachweis nach NOORDHOEK-HEGT untersucht.

Nur in der Aprotinigruppe war die Blutgerinnung in Richtung Hypokoagulabilität beeinflusst. Der gewebeständige Plasminogenaktivatorgehalt war nur nach intravenöser Gabe des synthetischen Antifibrinolytikums Tranexamsäure vermindert, und Antiplasmin im Gewebe nur nach Injektion des natürlichen Proteinaseinhibitors Aprotinin nachweisbar.

Die Injektion von Benzaron hatte keinen Einfluß auf die Blutgerinnung und die fibrinolytische Aktivität im Gewebe.

Der 2. Teil der Arbeit umfaßt 2 Langzeitversuche, bei denen Ratten 14 Tage lang Benzaron peroral verabreicht wurde. Bei

der 1. Serie wurde der Gehalt an gewebeständigen Plasminogenaktivatoren der Lunge und der Vena jugularis untersucht und dem der Kontrollgruppe gegenübergestellt. Es konnte gezeigt werden, daß die Gabe von Benzaron den Gehalt an gewebeständigen Plasminogenaktivatoren nicht über das physiologische Maß hinaus erhöht.

Im 2. Langzeitversuch wurde deshalb den Ratten nach 2-wöchiger Fütterung mit Benzaron der synthetische Fibrinolyseinhibitor Tranexamsäure intravenös verabreicht. Die Untersuchungen ergaben, daß nach Vorbehandlung mit Benzaron die Hemmung der gewebeständigen Fibrinolyse durch Tranexamsäure fast nicht zur Wirkung kommt.

9. SUMMARY

Two proteinase inhibitors (Aprotinin and Tranexamic acid) and Benzaron, which is used in human medicine to treat varicosis patients, were examined for their influence on blood coagulation and on tissue-bound activators and inhibitors of fibrinolysis.

The substances were applied to albino-rats by intravenous injection. 5 min. later blood samples were taken in order to estimate the thrombelastography and the partial thromboplastin-time.

The lungs and jugular veins were excised after perfusion with saline and examined by means of the fibrinolysis-autography (TODD) and the method of antiplasmin determination by NOORD-HOEK-HEGT. Only in the Aprotinin-group a prolongation of blood coagulation was found. The content of tissue-bound activator of plasminogen was only reduced after intravenous application of the synthetic proteinase inhibitor Tranexamic acid. Tissue-bound antiplasmin was only verifiable after injection of the natural proteinaseinhibitor Aprotinin. The intravenous application of Benzaron had no influence neither on blood coagulation nor on the fibrinolytic activity of the tissue.

In two further series of examinations Benzaron was applied per os to rats for 14 days.

In the first series the content of tissue-bound activators of plasminogen in the lung and jugular vein was determined and compared to the control group.

It was shown that Benzaron does not increase the physiologic content of tissue-bound activator^s of plasminogen.

Therefore in the second series the synthetic inhibitor of fibrinolysis was intravenously injected after two weeks of per oral application of Benzaron. The result was that after the treatment with Benzaron the inhibitory effect of Tranexamic acid does not show up any more.

10. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Albrechtsen, O.K.:
The fibrinolytic activity of human tissues.
Brit.J.Haematol. 3, 284-288 (1957)
- (2) Albrechtsen, O.K.:
The fibrinolytic activity of animal tissues.
Acta Physiol.Scand. 39, 284 (1957)
- (3) Asang, E.:
Wandlungen in der Therapie entzündlicher Erkrankungen der
Bauchspeicheldrüse. Bericht über 1 Jahr Therapie und
Prophylaxe mit dem Kallikrein- und Trypsin-Inaktivator
Trasylol (Bayer).
Langenbecks Arch.Chir. 293: 645-670 (1960)
- (4) Astedt, B.; Pandolfi, M.:
Ontogenesis of tissue plasminogen activator in the
human.
Thromb.Diath.Haemorrh. 25: 469-480 (1971)
- (5) Astrup, T.:
Tissue activators of plasminogen.
Fed.Proc. 25, 42-51 (1966)
- (6) Barchewitz, G.:
Fibrinolytische Wirkung von Fragivix^R im Bereich der
Venenwand beim varikösen Patienten.
In: Ergebnisse der Angiologie, Bd.11, 119-124,
F.K.Schattauer Verlag (1976)
- (7) Beard, E.L.; Mountouri, M.H.; Danos, G.J.; Busuttil,
R.W.:
Plasminogenactivator activity of rat lysosomes.
Proc.Soc.Exp. Biol.Med. 129, 804 (1968)

- (8) Beard, E.L.; Busuttil, R.W.; Gottshalk, S.K.:
Stress induced release of plasminogen activator from
lysosomes.
Thromb. Diath.Haemorrh. 21, 20 (1969)

- (9) Binon, F.:
Chemie des Benzaron (Fragivix^R).
In: Ergebnisse der Angiologie, Bd.11, 79-81
F.K.Schattauer Verlag, Stuttgart (1976)

- (10) Blasini, R.; Haas, S.; Krieglsteiner, P.; Wriedt-Lübbe,
I.; Erhardt, W.:
Erfassung gewebeständiger Inhibitoren gegen Plasmin
und ihre Beeinflussung durch Betamethason und Ambroxol.
Med.Welt 28, 1392-1394 (1977)

- (11) Blümel, G.:
Experimentelle und klinische Untersuchungen zum post-
traumatischen Geschehen.
In: W.Brendel, G.L.Haberland : Neue Aspekte der Trasylol-
Therapie 5: 95-106 (1972)

- (12) Broekhuysen, J.:
Pharmakokinetik von Fragivix^R beim Tier und Menschen.
In: Ergebnisse der Angiologie, Bd.11, 97-107,
F.K.Schattauer Verlag (1976)

- (13) Brotelle, R.:
Die antithrombotischen Eigenschaften von Fragivix^R.
In: Ergebnisse der Angiologie, Bd.11, 83-95
F.K.Schattauer Verlag, Stuttg. (1976)

- (14) Brunetti, S.; Tesi, M.:
Azione di alcuni farmaci sulla dinamica della fibrinolisi
nell' uomo.
Riv.Crit.Clin.Med.67: 233-245

- (15) Cochrane, C.G.; Revak, S.D.; Wuepper, K.D.:
Activation of Hagemann Factor in solid and fluid phases.
J.Exp.Med. 138: 1564-1583 (1973)
- (16) Colman, R.W.; Wong, P.Y.:
Participation of Hagemann Factor Dependent Pathways in
Human Disease States.
Thrombos.Haemostas.Stuttg., 751-775 (1977)
- (17) Dastre, A.:
Fibrinolyse dans le sang.
Arch.Physiol. , Paris, 5, 661 (1893)
- (18) Denk, S.; Blümel, G.; Kujat, R.; v.Sommogy, St.:
The different Effects of Natural and Synthetic Proteinase
Inhibitors on Tissue plasminogen Activators and Blood
Coagulation. In: New Aspects of Trasylol Therapy 8,
49-59 (1975), F.K.Schattauer Verlag, Stuttg.
- (19) Donner, L.; Houskova, J.:
Activité fibrinolytique du sang et des tissus chez
certains animaux.
Coagulation 3, 2: 133-137 (1970)
- (20) Douglas, A.S.; Ogston, D.:
Clinical physiology of the fibrinolytic enzyme system.
J.Clin.Pathol. 25: 615-618 (1972)
- (21) Frick, U.; Klein, G.:
Zur lokalen Fibrinolyse während der Operation.
Zentralbl. Chir. 97: 145-149 (1972)
- (22) Goethals, J.:
Fibrinolytische Wirkung von Fragivix^R im Bereich der
Venenwand beim varikösen Patienten.
In: Ergebnisse der Angiologie, Bd.11, 125-127,
F.K.Schattauer Verlag, Stuttg. (1976)
- (23) Haas, S.; Wriedt-Lübbe, I.; Blümel, G.:
Mechanismus der Fibrinolyseaktivierung und der Fibrino-
lysehemmung.
Med.Welt 29, 209-211 (1978)

- (24) Haberland, G.L.; Matis, P.:
Trasylol, ein Proteinaseinhibitor bei chirurgischen
und internen Indikationen.
Med.Welt 22: 1367-1376 (1967)
- (25) Haberland, G.L.:
Einleitende Bemerkungen zu den Grundlagen der Trasylol
Therapie.
In: Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd. 2, 1-9 (1967)
- (26) Herschlein, H.J.; Steichele, D.F.:
Die Wirkung des Fibrinolyse-Inhibitors AMCHA auf die
Blutgerinnung bei gesteigerter thromboplastischer Akti-
vität.
Klin.Wschr. 46, 102 (1968)
- (27) Janoff, A.; Weissman, G.; Zweifach, B.W.; Thomas, L.:
Pathogenesis of experimental shock IV. Studies on
lysosomes in normal and tolerant animals subjected to
lethal trauma and endotoxemia.
J.Exp.Med. 116: 451 (1962)
- (28) Janoff, A.:
Alterations in lysosomes (intracellular enzymes)
during shock; effects of preconditioning (tolerance)
and protective drugs.
In: Shock 93, Ed.Hershey, S.G.; Little and Brown Comp.,
Boston (1964)
- (29) Kaller, H.:
Enterale Resorption, Verteilung und Elimination von
4-Amino-cyclohexancarbonsäure (AMCHA) und E-Aminocapron-
säure (ACS) beim Menschen.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Exp.Path.Pharmak. 256,
160-168 (1967)
- (30) Kaller, H.:
Pharmakologie von Trasylol.
In: Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd.2, 11-18
(1967), F.K.Schattauer Verlag, Stuttgart

- (31) Kaplan, A.P.; Castellino, F.J.; Collen, D.; Wiman, B.; Taylor, F.B.:
Molecular Mechanisms of Fibrinolysis in Man.
Thrombos.Haemostas. Stuttgart, 39, 263-283 (1978)
- (32) Koller, F.:
Zur Physiologie der Fibrinolyse.
In: V.Hiemeyer: Therapeutische und experimentelle Fibrinolyse: 1-7, F.K.Schattauer Verlag, Stuttg. (1969)
- (33) Kwaan, H.C. ; Astrup, T.:
Fibrinolytic activity in thrombosed veins.
Circ.Res. 17, 6: 477-483 (1965)
- (34) Kwaan, H.C.; Astrup, T.:
Demonstration of cellular fibrinolytic activity by the histochemical fibrin slide technique.
Lab.Invest.17, 2: 140-145 (1967)
- (35) Lauritsen, O.S.:
The fibrinolytic enzyme system and trypsin inhibitor as measured by the casein method.
Dan.Med.Bull.17, Supp.II: 8-64 (1970)
- (36) Lohmann, K.; Markwardt, F.; Landmann, H.:
Zusammenhänge zwischen Konstitution und Wirkung bei Hemmstoffen der Fibrinolyse.
Thromb.Diathes.Haemorrh. 10, 424-430 (1963)
- (37) Markwardt, F.; Landmann, H.; Klöcking, H.-P.:
Fibrinolytika und Antifibrinolytika.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1972)
- (38) Matis, P.:
Wirkungen von Trasylol auf Blutgerinnung und Wundheilung.
In: Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd.2, 19-38 (1967), F.K.Schattauer Verlag, Stuttg.
- (39) Melander, B.; Gliniecki, G.; Granstrand, B.; Hanshoff, G.:
Biochemistry and toxicology of Amikapron^R; the antifibrino-

lytically active isomer of AMCHA (A comparative study with ϵ -Aminocaproic acid).

Acta pharmacol. (Kbh.) 22, 340-352 (1965)

- (40) Neil, E.:
Methods for improving the sensitivity and specificity of the fibrin plate.
J.Clin.Pathol. 25: 335-337 (1972)
- (41) Nilsson, I.M.:
Fibrinolytic activity of human veins.
In: V.Hiemeyer: Therapeutische und experimentelle Fibrinolyse: 53-57, F.K.Schattauer Verlag, Stuttg. (1969)
- (42) Noordhoek-Fegt, V.; Brakman, P.:
Inhibition of Fibrinolysis by the Human Vascular Wall Related to the Presence of Smooth Muscle Cells.
Haemostas. 3, 118-128 (1974)
- (43) Noordhoek-Hegt, V.; Brakman, P.:
Histochemical Demonstration of Inhibition of Fibrinolysis in Human tissue by Means of the Fibrin Slide Sandwich Technique.
Progr.in Chem.Fibrinol. and Thrombol.1, New York, 258-269 (1975)
- (44) Okamoto, S.; Sato, S.; Takada, Y.; Okamoto, U.:
An active stereoisomer (transform) of AMCHA and its antifibrinolytic (antiplasminic) activity in vitro and in vivo.
Keio J.Med. 13, 177-185 (1964)
- (45) Pandolfi, M.; Robertson, B.; Isacson, S.; Nilsson, I.M.:
Fibrinolytic activity of human veins in arms and legs.
Thromb.Diath.Haemorrh. 20, 247-256 (1968)
- (46) Pandolfi, M.:
Studies on fibrinolysis in some tissue and in aqueous humor.
Habilitationsschrift (1969)

- (47) Pandolfi, M.:
Histochemistry and assay of plasminogen activator (s).
Rev.Europ.Etud.Chir.et Biol.17, 254-260 (1972)
- (48) Pandolfi, M.; Bjernstad, A.; Nilsson, J.M.:
Technical remarks on the microscopical demonstration on
tissue plasminogen activator.
Thromb.Diath.Haemorrh. 88-98 (1972)
- (49) Pick, C.R.; Cater, D.B.:
Plasminogen activator of the blood vessels in tumours
and in Carrageenin-induced granulomas.
J.Exp.Pathol. 52: 14-22 (1971)
- (50) Robbins, K.C.; Summaria, L.; Hsieh, B.; Shah, R.J.:
The peptide chains of human Plasmin.
J.Biol.Chem., 242, 2333 (1967)
- (51) Schlindwein, D.:
Experimentelle Untersuchungen über die 4-(Aminomethyl)-
cyclohexancarbonsäure (AMCHA) als Antifibrinolyticum-
Antiproteolytikum.
Dissertation, München (1965)
- (52) Stamm, H.:
Einführung in die Klinik der Fibrinolyse.
S.Karger Verlag, Basel (1962)
- (53) Tilsner, V.:
Beeinflussung der Blutgerinnung durch Benzaron.
Med.Welt , Bd.28, Heft 42, 1728-1729 (1977)
- (54) Todd, A.S.:
The histological localization of fibrinolysin activator.
J.Path.Bact. 78, 281 - 283 (1964)
- (55) Todd, A.S.:
Localization of fibrinolytic activity in tissues .
Brit.Med.Bull. 20, 210- 212 (1964)

- (56) Turner, R.H.; Kurban, A.K.; Ryan, T.J.:
Fibrinolytic activity in human skin following epidermal
injury.
J.Invest.Dermatol. 53, 458-462 (1969)
- (57) Werle, E.:
Zur Biochemie und Physiologie der Proteinasen - In-
hibitoren.
Ärztl.Forsch. 22: 41-48 (1968)
- (58) Werle, E.:
Zur Biochemie des Trasylol.
In: Neue Aspekte der Trasylol Therapie , Bd. 3, 49-59
(1969), F.K.Schattauer Verlag, Stuttgart
- (59) Werle, E.:
Trasylol: Ein kurzer Überblick über Geschichte, Biochemie
und Wirkungen.
In: Neue Aspekte der Trasylol Therapie, Bd.5, 9-16 (1972)
F.K.Schattauer Verlag, Stuttgart
- (60) Witt, J.:
Biochemie der Blutgerinnung und Fibrinolyse.
Verlag Chemie, Weinheim (1975)
- (61) Wiman, B.; Wallen, P.:
The specific interaction between plasminogen and
fibrin. A physiological role of the lysine binding site
in plasminogen.
Thrombos.Res.1, 213-222 (1977)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.med.
Günther Blümel, dem Leiter des Institutes für
Experimentelle Chirurgie, für die Überlassung des Themas,
sowie für seine großzügige Unterstützung und die kriti-
sche Stellungnahme zu den Ergebnissen der Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso Frau Dr.S.Haas für ihre Ratschläge
zur Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit
sowie für ihre Unterstützung bei der Abfassung des Manus-
kripts.

Für die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse möchte
ich mich ferner bei Frau Dr.I.Wriedt-Lübbe bedanken.

Für die technische Unterstützung danke ich allen Mit-
arbeitern des Institutes für Experimentelle Chirurgie
der Technischen Universität München.

LEBENS LAUF

Am 30. April 1953 wurde ich als Tochter des Rechtsanwalts, Hans Graf von der Goltz und seiner Ehefrau Luitgard, geb. Gräfin zu Solms Laubach, in Düsseldorf als zweites von drei Kindern geboren.

Von 1959 - 1963 besuchte ich in Duisburg die Volksschule an der Mozartstrasse und anschließend das neusprachliche Frau Rat Goethe-Gymnasium, an dem ich im Mai 1971 das Abitur bestand.

Von Oktober 1971 an studierte ich an der Justus Liebig Universität in Gießen Tiermedizin. Nach dem Physikum im April 1974 wechselte ich an die Ludwig Maximilians Universität in München über, wo ich im Sommer 1977 das Staatsexamen ablegte.

